细胞自噬介导的动物脂代谢及其检测

田 铃[1,#,*], 郭三友[1,#], 吴文梅[1], 王玉洁[1], 李 康[2]

(1. 华南农业大学动物科学学院, 广东省农业动物基因组学与分子育种重点实验室/广东省蚕桑工程技术研究中心, 广州 510642;
2. 华南师范大学生命科学学院, 广州市昆虫发育调控与应用研究重点实验室, 广州 510631)

摘要: 细胞自噬(autophagy)是从酵母到哺乳动物都高度保守的、降解胞内物质的过程,受到能量和营养等信号的严格调控。已有研究表明,哺乳动物中高脂饮食可诱导肝脏内自噬的发生,某些自噬相关基因(autophagy related genes, *Atg*)敲除后阻碍肝脏细胞的脂代谢,并导致脂滴堆积,形成脂肪肝。昆虫中的现有研究也暗示细胞自噬与昆虫脂肪体的代谢密切相关。目前为止,细胞自噬调控脂代谢的研究还有许多不明之处。除已报道的 ATG 蛋白外是否其他 ATG 蛋白也参与脂代谢尚无报道;已知的参与脂代谢的 ATG 蛋白分子作用模式不清楚;溶酶体中哪些酶参与了自噬介导的脂代谢也未被证实。ATG 蛋白差异参与真菌和高等动物的脂滴形成与脂肪降解,但具体机制不详,昆虫的进化地位介于高等动物和真菌之间,昆虫中开展自噬介导脂代谢的研究对于解析高等动物的疾病诸如肥胖症、高血脂症,及以昆虫脂肪体代谢发育为调控靶标的工作具有重要意义。为此,本文对主要在哺乳动物中获得的自噬介导脂代谢的研究进展进行综述,并对脂代谢的一些研究方法和检测技术进行了总结,以期为昆虫乃至其他生物的相关研究提供借鉴与参考。

关键词: 细胞自噬; 自噬体; 自噬相关蛋白; 脂肪体; 脂代谢

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2017)03-0347-10

Autophagy-mediated lipid metabolism in animals and its detection

TIAN Ling[1,#,*], GUO San-You[1,#], WU Wen-Mei[1], WANG Yu-Jie[1], LI Kang[2] (1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Agro-animal Genomics and Molecular Breeding/Guangdong Provincial Research Center for Sericultural Engneering and Technology, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Guangzhou Key Laboratory of Insect Development Regulation and Application Research, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: Autophagy is a ubiquitous process of intracellular self-degradation, which is well conserved from yeasts to mammals and strictly regulated by upstream signaling pathways such as energy and nutrient. Studies in mammals have shown that autophagy has a close relationship with lipid metabolism. Autophagy could be induced by high level of lipid in dietary, while knockout of some autophagy related genes (*Atg*) can block lipid degradation in liver and cause accumulation of lipid droplets. Studies in insects also imply that autophagy is important for lipid degradation. Up to now, there are still many questions remaining unanswered on the autophagy-mediated lipid metabolism. Besides a few identified ATG proteins, whether some other ATG proteins are also involved in lipid metabolism has not been reported. The molecular mechanism of lipid metabolism regulated by identified ATG proteins is unclear.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31472042, 31672368)

作者简介: 田铃, 女, 1980 年 2 月生, 满族, 辽宁鞍山人, 博士, 教授, 研究方向为昆虫遗传与发育, E-mail: tianling@scau.edu.cn;
郭三友, 女, 1990 年 5 月生, 四川眉山人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫遗传与发育, E-mail: guosayo123@163.com

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

[*] 通讯作者 Corresponding author, E-mail: tianling@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-11-06; 接受日期 Accepted: 2017-02-13

What enzymes in the lysosome participate in autophagy-mediated lipid metabolism has not been confirmed. In addition, ATG proteins differently participate in lipid droplet formation and lipid degradation in fungi and higher animals, but the mechanism is unknown. The evolutionary status of insects is between fungi and higher animals, the studies of autophagy-mediated lipid metabolism in insects will be helpful for uncovering the mechanisms underlying obesity and hyperlipidemia in higher animals, and also have great significance in the researches with the metabolism and development in the fat body of insects as the regulating targets. So in this article we summarized the progress of autophagy-mediated lipid metabolism mainly in mammals, and introduced the research methods and detection techniques of lipid metabolism to enlighten the related studies in insects and other organisms.

Key words: Autophagy; autophagosome; autophagy related protein (ATG); fat body; lipid metabolism

细胞自噬是真核生物中普遍存在的细胞自我吞噬的现象,当营养匮乏时自噬被大规模诱导并进行底物降解。近年来的研究发现,细胞自噬除能降解胞内受损细胞器、长寿命蛋白、脂类、糖类等来维持细胞稳态外(Yorimitsu and Klionsky, 2005; Galluzzi *et al.*, 2014),被证实与哺乳动物的疾病,如帕金森综合症、阿茨海默症等神经退行性疾病的发生密切相关(Shintani and Klionsky, 2004; Klionsky *et al.*, 2016),还被揭示可作为一种机体免疫反应,清除入侵的细菌和病毒等微生物(Moy and Cherry, 2013)。由此可见,细胞自噬在代谢、生长发育和先天免疫中具有重要作用。研究表明,哺乳动物的肝脏和脂肪组织作为机体能量储备和转换的场所,其代谢状态同样受到细胞自噬的影响,高血脂、糖尿病、肥胖症、脂肪肝等疾病的发生也与自噬密切关联(Klionsky *et al.*, 2016; Ueno and Komatsu, 2017)。昆虫脂肪体是哺乳动物肝脏的同源器官,笔者等近年的初步研究也显示细胞自噬介导了家蚕 *Bombyx mori* 脂肪体细胞的代谢和发育。本文对主要在哺乳动物中获得的细胞自噬参与调控脂代谢的有关研究进展进行了较详细的综述,并对当前脂代谢的相关研究方法和检测技术进行了归纳总结,旨在为昆虫及其他物种中细胞自噬介导脂代谢的相关研究提供借鉴与参考。

1 细胞自噬的发生

1956 年 Clark 在新生小鼠的肾脏细胞中观察到大量膜质结构的致密体,并由 Christian De Duve 于 1963 年在国际溶酶体大会上将这种现象定义为细胞自噬。细胞自噬可分为大自噬(macroautophagy)、小自噬(microautophagy)和分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA)。大自噬可分为非选择性自噬途径和选择性的 Cvt(cytoplasm to vacuole targeting)途径。非选择性自噬发生时,自噬体(autophagosome,又称自噬小体)外膜与溶酶体/液泡融合,随后溶酶体/液泡内的水解酶降解自噬体膜及其内含物(Huang and Klionsky, 2002; Yorimitsu and Klionsky, 2005; Klionsky *et al.*, 2016)。Cvt 途径最先发现于受饥饿的酵母细胞中(Baba *et al.*, 1997),主要吞噬细胞质成分形成 Cvt 泡(Cvt vesicle)(图 1)。小自噬是依靠溶酶体膜或液泡膜的凹陷来包裹细胞质成分并对其进行降解的过程,过氧化物酶体的降解是最典型的小自噬(Huang and Klionsky, 2002; Klionsky *et al.*, 2016)。分子伴侣介导的自噬主要是在分子伴侣的帮助下降解含有"五肽共基元"(pentapeptide consensus motif)——KFERQ 的特异胞质蛋白的过程(Massey *et al.*, 2004; Klionsky *et al.*, 2016)。相比小自噬和分子伴侣介导的自噬,大自噬是唯一能够降解细胞器和细胞质大分子聚集体(如致密体)的自噬方式。

细胞自噬的发生以自噬体的形成为标志(下文提到的细胞自噬均指大自噬)。自噬体的形成需要在多种自噬相关蛋白(autophagy related protein, ATG)的参与下完成:当自噬被诱导后,首先 ATG1 (ULK1)/ATG13 蛋白激酶复合体因磷酸化/去磷酸化修饰起始自噬体的形成;随后,细胞内的微小自噬体膜(autophagosomal membranes,高等动物中膜的来源尚不清楚)脱落形成杯状隔膜,在 Beclin1/ATG6-PIK3C3/Vps34 蛋白复合体的参与下发生成核(Mariño *et al.*, 2014; Klionsky *et al.*, 2016)(图 2: A);最后,在ATG12-ATG5-ATG16和ATG8-PE两个泛素样蛋白系统成员的参与下逐渐延伸并形成大小约 300~900 nm(酵母中)的双层膜结构的自噬体,哺乳动物的自噬体会更大,约为 500~1 500 nm (Yorimitsu and Klionsky, 2005; Wen and Klionsky,

图 1　酵母细胞中自噬和 Cvt 途径的形态特征（引自 Yorimitsu and Klionsky，2005）

Fig. 1　Autophagy and the Cvt pathway in yeasts (adopted from Yorimitsu and Klionsky, 2005)

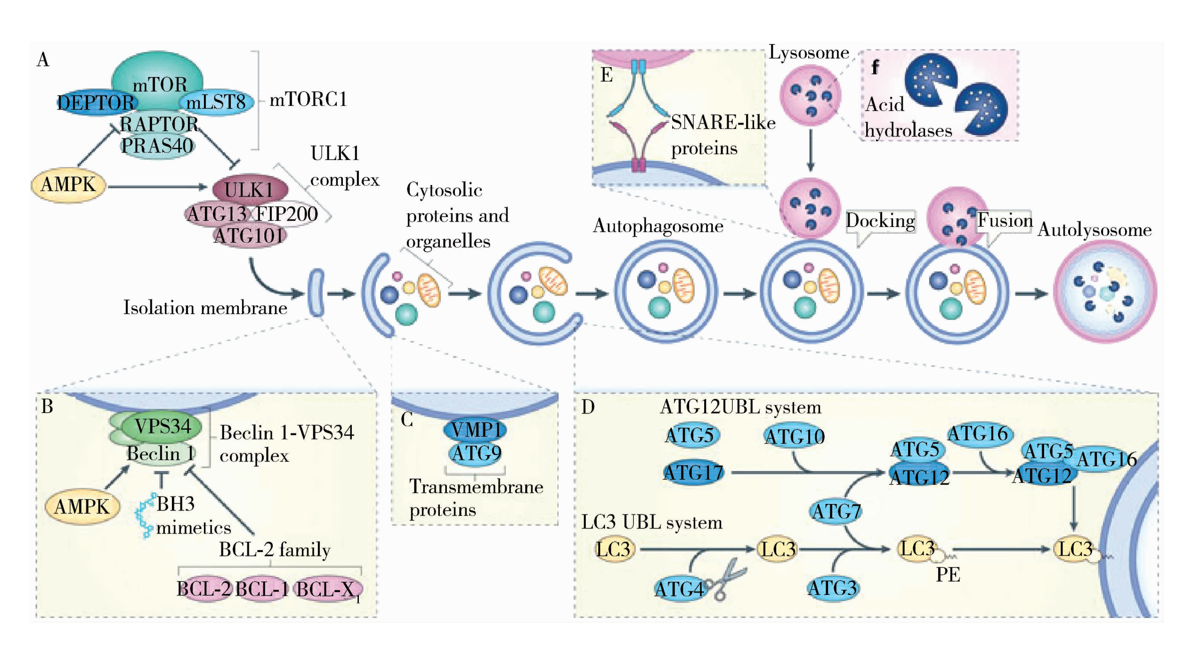


图 2　自噬发生的核心——从隔离膜到自噬体的形成（引自 Mariño *et al.*，2014）

Fig. 2　The core autophagy pathway starts with the formation of an isolation membrane (adopted from Mariño *et al.*, 2014)

2016；Klionsky *et al.*，2016）（图 2：B）。自噬体成熟后，哺乳动物细胞的多种骨架蛋白将自噬体运送至溶酶体，自噬体外膜与溶酶体通过相关蛋白识别机制发生融合，形成自噬溶酶体（autolysosome）进行底物降解（图 2：C～F），随后产生的小分子物质在膜通透酶的作用下被释放进细胞质供细胞重新利用

(Mariño *et al*., 2014; Klionsky *et al*., 2016)。目前,在酵母中已经发现了 30 多个 *Atg* 基因(Duan *et al*., 2013; van Zutphen *et al*., 2014),哺乳动物中鉴定到了大部分同源基因,在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中先后鉴定了近 20 个 *Atg* 同源基因,在家蚕基因组中预测或鉴定到了 14 个 *Atg* 同源基因(Chang and Neufeld, 2010; Li *et al*., 2011; Tian and Li, 2015)。

2 细胞自噬发生的调控

2.1 调控细胞自噬发生的上游信号

细胞自噬受多种上游信号的调控,其中最主要的是营养和能量信号。TOR(target of rapamycin)作为营养感受器,是一种非典型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可整合上游的多种信号因子(如正向调控因子 PI3K 和氨基酸,负向调控因子 AMPK)参与基因转录、蛋白质翻译、核糖体合成等生物过程,并负调控细胞自噬的发生(Chang and Neufeld, 2010; Klionsky *et al*., 2016)。在不同物种中,TOR 信号调控 ATG1/ATG13 蛋白复合体参与细胞自噬发生的机制存在差异:当营养充足时,酵母中的 TOR 通过磷酸化 ATG13 抑制 ATG1 与其结合阻碍自噬发生;在果蝇中 ATG1 和 ATG13 蛋白始终结合在一起,TOR 信号通过磷酸化 ATG1 抑制细胞自噬发生;在哺乳动物中,ULK1(ATG1)则始终与 ATG13, ATG101 和 FIP200 结合形成 3MDa 的复合体,当细胞自噬发生时 TOR 与复合体解离,ATG13 磷酸化下降而 ULK1 获得活性增强对 FIP200 的磷酸化起始自噬(Chang and Neufeld, 2010)。能量响应因子 AMPK(AMP-activated protein kinase)不仅可以通过负调控 TOR 信号诱导细胞自噬的发生,同时其还可以直接磷酸化哺乳动物中的 ULK1 而起始细胞自噬(Egan *et al*., 2011)。FOXO 家族作为转录调控因子受到 AKT(v-akt murine thymoma viral oncogene homolog)、JNK(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号的调控,有研究报道 FOXO3 可以在转录水平上调控 *Atg* 基因的表达而导致细胞自噬的发生(Mammucari *et al*., 2007)。

在昆虫中,除受营养和能量信号的调控外,细胞自噬还受到主导蜕皮和变态的蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)的诱导(Yin and Thummel, 2005; Tian *et al*., 2013)。在果蝇和家蚕中的研究发现,一方面 20E 通过激活其受体复合物 EcR/USP 和早期转录因子诱导几乎所有 *Atg* 基因的表达,导致家蚕脂肪体细胞自噬大规模发生;同时,20E 通过抑制 PI3K-TOR 信号,起始 ATG1 蛋白复合体活性参与细胞自噬(Yin and Thummel, 2005; Tian *et al*., 2013)。在家蚕幼虫-蛹变态的非摄食期,随着血淋巴中 20E 滴度的升高,幼虫组织中肠、丝腺发生细胞自噬先与凋亡(apoptosis)的程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)(Li *et al*., 2010, 2011; Franzetti *et al*., 2012)。

2.2 ATG 蛋白的翻译后修饰对细胞自噬发生的调控

细胞自噬的发生除受到上游信号调控外,还受到 ATG 蛋白的翻译后修饰方式的影响。ATG 蛋白可发生磷酸化、乙酰化、脂化、糖基化、泛素化等多种翻译后修饰,这些修饰方式对 ATG 蛋白的功能发挥、亚细胞定位、蛋白稳态等起到了关键作用(Wani *et al*., 2015)。目前为止,ATG 蛋白的翻译后修饰方式研究得最多的是磷酸化,其次是在酵母和哺乳动物细胞中已报道的乙酰化修饰。

ATG 蛋白中,除了 ULK1/ATG13 蛋白复合体可受 TOR 磷酸化修饰外,哺乳动物中的 ATG9, LC3, ATG29 和 ATG31 及自噬底物 SQSTM1/P62 均存在磷酸化修饰(Wani *et al*., 2015)。乙酰化是 ATG 蛋白翻译后修饰的另一种重要方式,在哺乳动物中乙酰转移酶 P300 通过乙酰化 ATG5, ATG7, LC3 和 ATG12 抑制细胞自噬的发生,敲除 P300 基因能够增加自噬流(Lee and Finkel, 2009)。核内去乙酰化酶 SIRT1 将 LC3 的第 49 和 51 位赖氨酸去乙酰化后致使其出核,促进细胞自噬的发生(黄锐, 2013)。饥饿诱导酵母 ATG3 的 Lys19, Lys48 和 Lys183 发生乙酰化,其中 Lys19 和 Lys48 的乙酰化修饰对自噬发生起关键作用(Yi *et al*., 2012),由此可见同一 ATG 蛋白不同位点的乙酰化修饰可能导致其对细胞自噬发生的影响不同。

3 细胞自噬介导脂代谢的研究进展

脂肪主要以中性脂质-甘油三酯和胆固醇形式储存于脂滴(lipid droplet)(van Zutphen *et al*., 2014)。当营养被剥夺时,细胞通过启动两种途径来维持能量稳态,一种是通过激活脂肪酶将脂肪降解为脂肪酸,另一种是启动细胞自噬来介导脂肪降解。早在 1979 年,Debeer 等就提出细胞自噬可能与脂代谢有紧密联系(Debeer and Thormas, 1979),

Singh 等在 2009 年首次证实细胞自噬介导了小鼠肝脏细胞的脂肪降解，认为自噬是一种新的选择性降解脂质的途径，并称之为“噬脂”（lipophagy）（Singh *et al.*, 2009；van Zutphen *et al.*, 2014）。

3.1　噬脂发生的调控

自噬作为一种调节因子可参与脂肪的降解和储存（Duan *et al.*, 2013；Galluzzi *et al.*, 2014）。哺乳动物中的研究表明，抑制自噬体的形成或是阻碍自噬体——溶酶体的融合均能导致肝脏细胞发生脂肪累积；相反，上游信号激活或是 *Atg* 基因的遗传操作诱导自噬的发生则可以促进脂肪的降解。RNA 干扰或是敲除小鼠 *Atg* 基因如 *Atg*5，*Atg*7，*vps*34 和 *Atg*14，抑制自噬体的形成，则导致肝脏细胞发生脂滴累积，甘油三酯含量增加（Singh *et al.*, 2009；Yang *et al.*, 2010；Jaber and Zong, 2013）；当存在脂质合成刺激时，利用 3-甲基腺嘌呤（3-methyladenine，3-MA）抑制自噬可以增加肝脏细胞的甘油三酯和胆固醇含量，此外氯喹（chloroquine，CQ）阻断溶酶体酸化也可以降低乙醇诱导的自噬和脂代谢（Ding *et al.*, 2010），而溶酶体酸化的另一抑制剂巴弗洛霉素（bafilomycin A1，Baf）具有与 CQ 类似的功能，可以阻碍噬脂的发生（He *et al.*, 2016）。

2 型糖尿病治疗的药物也被报道可通过激活 AMPK 或是抑制 TOR 活性来诱导自噬的发生，促进脂肪的降解（Wang *et al.*, 2015）。研究表明，胰高血糖素样肽-1 通过促进 AMPK 信号抑制 TOR 信号诱导自噬来降低高脂饮食的肥胖小鼠肝脏的重量以及血脂的含量（He *et al.*, 2016）；津力达颗粒（Jinlida granule）也是通过活化胰腺 βNIT-1 细胞中的 AMPK 进而激活自噬抑制棕榈酸诱导的脂肪累积（Wang *et al.*, 2015）。饥饿通过抑制 TOR 信号的活性激活细胞自噬，增加包裹脂滴的自噬体、自噬溶酶体的数量（Singh *et al.*, 2009；Wang *et al.*, 2015）。利用 TOR 的抑制剂雷帕霉素（rapamycin）诱导肝脏细胞自噬发生后，能够降低脂滴大小及数量，减缓脂肪累积，减小肝细胞体积（李金存等，2014；Martinez-Lopez and Singh, 2015；Farah *et al.*, 2016）。*Atg* 基因的遗传操作同样可以导致脂肪降解的发生，在小鼠肝细胞中过表达人的 ULK1/ATG1 后，诱导自噬发生，并降低肝脏细胞脂肪含量（Farah *et al.*, 2016）。相似研究发现，在肥胖小鼠肝脏细胞特异性表达 *Atg*7 后，改善了肝脏对胰岛素信号的敏感性，降低肝脏内糖和甘油三酯水平（Yang *et al.*, 2010）。过表达 *Atg*14 可降低高脂饮食及特异性缺失 *FoxO* 基因的小鼠肝脏细胞中甘油三酯的含量（Xiong *et al.*, 2012）。哺乳动物中的研究显示，上游调控信号、自噬体形成以及自噬体-溶酶体融合均在噬脂的发生中起到了关键的作用。

3.2　细胞自噬介导脂代谢的分子机制

目前，尽管已报道了一些 *Atg* 基因丧失功能或是获得功能后对脂肪降解有影响，但是它们的具体作用机制不详，是否其他 ATG 蛋白为噬脂所必需也尚无报道，在已报道的研究中，LC3（Atg8）蛋白的分子作用关注较多。免疫电镜观察显示，在肝脏细胞中 LC3 不仅可以定位在被自噬体包裹的脂滴上，有时还可密集地定位在小密度的脂滴表面，即使是 *Atg*5 或 *Atg*7 敲除后，Western blotting 检测分离的脂滴发现 LC3-Ⅰ型蛋白（酵母中 ATG8 的同源蛋白）依然可以定位在脂滴上，证实在自噬体与脂滴结合之前 LC3 蛋白就可以与脂滴表面结合，并且只有 LC3-Ⅱ型蛋白与脂滴的标记——围脂蛋白 Perilipin 定位在相同的脂滴组分中（Shibata *et al.*, 2009，2010）。这些结果都暗示 LC3 蛋白可能对脂质的稳态起到了关键的作用，但 LC3 蛋白的Ⅰ和Ⅱ型在脂代谢中是否存在着功能上的差异还不知。与自噬体的形成一样，溶酶体的活性为噬脂所必需，免疫荧光染色结果显示溶酶体膜蛋白 Lamp1 与脂滴发生共定位，饥饿或是雷帕霉素诱导的自噬增加两者的共定位（Singh *et al.*, 2009）；敲除溶酶体膜相关基因 *Lamp*2 后，发现自噬溶酶体泡大量累积，自噬被抑制，证实溶酶体在噬脂中发挥着重要功能，目前溶酶体中哪些酶参与代谢自噬体包裹的脂质尚不清楚（Tanaka *et al.*, 2000）。

另有研究表明，在同一组织的不同发育时期/不同生理状态下，ATG 蛋白差异参与脂肪降解或是脂滴形成。有研究表明，LC3 蛋白不仅介导脂肪降解还为脂滴形成所必需，RNA 干扰 LC3 后，肝脏细胞、心肌细胞、神经细胞内诱导合成的脂滴数量减少（Shibata *et al.*, 2010）。饥饿处理 24 h 导致小鼠胚胎成纤维细胞内脂滴大小和数量增加，而 3-MA 或 Baf 处理后抑制脂滴数量的增加，可能是自噬促进了细胞膜上的脂肪酸转运至脂滴储存起来以便交付给线粒体氧化分解。尽管在上述相同饥饿的条件下，*Atg*5 敲除及 3-MA 或 Baf 处理都会影响上述脂肪酸转运的发生，但 *Atg*5 敲除的细胞较野生型未见脂滴发生额外的累积，具体机制不详（Rambold *et al.*, 2015）。将敲除 *Atg*7 后 16 周大小的小鼠饥饿 24 h 后，其肝脏甘油三酯含量和脂滴数量明显高于

正常小鼠(Singh *et al.*, 2009),而利用 RNA 干扰 4 ~ 8 周大小小鼠的 *Atg*7 表达,饥饿条件下并没有观察到肥胖型小鼠肝脏出现脂质沉着或血清中脂肪酸含量的变化(Yang *et al.*, 2010),可能与在不同发育阶段进行实验有关,这也表明自噬在脂质降解与脂滴形成中的作用远比想象的要复杂。

此外,在不同物种中,同源 ATG 蛋白在脂代谢的功能可能也存在差异。已知在酵母细胞中,当氮源缺失时,液泡快速内陷,将脂滴包裹并进行消化,而且在 *ypt*7(*Rab family GTPase*7)突变型酵母中表达 *GFP-Atg*8 后,细胞虽能够正常形成自噬体,但并未发现对脂滴进行包裹,同时发现自噬体并不与液泡发生融合,反而脂滴与液泡融合,由此证实酵母细胞内的液泡参与脂代谢,并在功能上类似于自噬体(van Zutphen *et al.*, 2014)。酵母中发现 ATG1 和 ATG8 非脂滴合成所必需,但 ATG15 既负责液泡中甘油三酯的降解,也参与脂肪酸从头合成(van Zutphen *et al.*, 2014)。但在真菌 *Metarhizium robertsii* 中敲除 *Atg*8 基因后,细胞自噬降低,脂滴特异性围脂蛋白及脂储存量明显降低,敲除 *Atg*1, *Atg*4 和 *Atg*15 基因后,脂滴累积也同样明显受损(Duan *et al.*, 2013)。由此推测,在不同物种中同源 ATG 蛋白在脂质合成与代谢平衡调节上的功能可能也存在较大的差异。

自噬与脂代谢密切相关,两者相互依赖相互制约,一旦失衡就会引起许多疾病的发生。细胞内脂肪酸过量一定程度上会损伤自噬的清除功能;同时,自噬功能的降低,减缓了脂肪降解,使胞内脂滴增加,而脂滴的增加加重自噬负荷,损害自噬功能,如此恶性循环,从而引发多种疾病的发生,比如肥胖、血脂异常、脂肪肝等(Singh *et al.*, 2009)。总的说来,自噬一方面可调节脂滴降解,另一方面可参与控制脂滴形成,但是其精确的调节机制目前尚不清楚。

3.3 昆虫中细胞自噬与脂肪体代谢的研究进展

得益于果蝇遗传学的发展,昆虫中细胞自噬的研究主要集中于果蝇,但是早在 20 世纪 60 年代人们就率先在鳞翅目昆虫美人蕉卷叶弄蝶 *Calpodes ethlius* 的幼虫中进行了自噬的相关研究(Romanelli *et al.*, 2014)。尽管鳞翅目昆虫无法像果蝇一样成功发展为模式动物,但近年来在鳞翅目昆虫尤其是家蚕中开展的工作,丰富了昆虫中细胞自噬发生机制的研究。在昆虫的变态发育过程中,一些老旧的器官与组织需经由细胞自噬和凋亡两种 PCD 方式消除并回收营养物质,为重新形成的器官提供物质来源。昆虫的脂肪体类似于哺乳动物肝脏和脂肪组织,是重要的能量代谢和物质储存中心,在昆虫的变态发育过程中发生重塑。

研究发现,20E 和饥饿均可以作为上游信号调控果蝇和家蚕脂肪体中细胞自噬、凋亡的发生。在家蚕中的研究发现,20E 和饥饿还可以促进自噬与凋亡之间的分子互作,BmATG5/BmATG6 全长分子促进细胞自噬,20E 和饥饿信号可以诱导家蚕 BmATG5 和 BmATG6 蛋白发生剪切,它们的截短分子 BmATG5-tN 和 BmATG6-C(C1/C2)则可以直接触发细胞凋亡,并具有在 20E 和饥饿信号中增强细胞凋亡的功能,可见家蚕中的 BmATG5 和 BmATG6 蛋白是自噬向凋亡转换的分子开关(Xie *et al.*, 2016)。此外,一些研究初步表明,20E 和饥饿在果蝇和家蚕中通过诱导细胞自噬的发生促进了脂肪体中的脂肪降解。在幼虫-蛹变态时期,20E 信号中断后造成家蚕脂肪体内的细胞自噬异常,透射电镜观察显示脂肪体细胞内脂滴体积变大,数目较对照多;在幼虫-蛹变态时期,干扰家蚕中 *Atg*1 基因的功能后,则出现类似于 20E 信号受阻、脂滴发生累积的表型,暗示细胞自噬可能介导了幼虫-蛹变态时期家蚕脂肪体内的脂肪降解(Tian *et al.*, 2013; Tian and Li, 2015)。有研究表明,在正常摄食的情况下,超表达 *Atg*1 造成果蝇脂肪体细胞体积急剧减小,暗示细胞自噬放大后对果蝇脂肪体细胞脂肪累积和细胞发育造成了影响;在果蝇中突变 *Atg*1 或是 *Atg*13 基因后,饥饿不能再正常诱导脂肪体细胞自噬的发生,并且 *Atg*1 或 *Atg*13 基因突变后的细胞大小显著大于周围野生型细胞(Chang and Neufeld, 2010)。笔者等在家蚕中发现,RNA 干扰重要的 *Atg* 基因均可抑制自噬体形成,导致上蔟时期脂肪体内能量代谢受阻,幼虫-蛹转化推迟或出现死亡等表型,而在细胞自噬大量发生时阻碍溶酶体与自噬体的融合同样会导致脂肪体脂滴发生累积,进一步证实自噬体-溶酶体的融合为饥饿诱导的脂代谢所必需(未发表资料)。此外,细胞自噬与脂肪降解之间存在着双向调节作用,研究表明当饥饿诱导自噬发生时,果蝇脂脱氢酶 Desat1 可以定位在自噬体结构上,*Desat*1 突变后细胞自噬不能被饥饿正常诱导(Köhler *et al.*, 2009)。在果蝇和家蚕中的研究发现,ATG 蛋白参与的细胞自噬与昆虫能量等物质代谢和脂肪体发育密切相关,鉴于自噬介导的脂代谢研究在真菌和高等动物中尚有许多问题不明,昆虫作为一个进化地位中间的物种,开展自噬与脂代谢的相关研究不仅

能解析和丰富细胞自噬重要生理功能的分子机理，同时也能为高等动物脂代谢相关疾病的研究提供借鉴与参考（Chang and Neufeld，2010；Tian *et al*.，2013）。

4 脂代谢的研究方法与检测技术

4.1 放射化学法

放射化学法是一种经典的研究脂肪合成或降解的方法，该方法首先的细胞培养液中添加同位素^{14}C标记的油酸盐进行培养，一定时间后对标记的细胞进行实验处理，提取总的脂质进行薄层层析（thin-layer chromatography），对应的甘油三酯或是游离脂肪酸的条带则可以通过放射自显影来进行鉴别（Shibata *et al*.，2010）。

4.2 脂肪酸脉冲示踪法（pulse-chase assay）

在饥饿对小鼠胚胎成纤维细胞脂滴形成的影响的研究中，作者用到了脂肪酸脉冲示踪的方法，首先在一个饱和的、C12 的脂肪酸疏水端共价结合氟化硼二吡咯（dipyrromethene boron difluoride，BODIPY）558/568 荧光基团，形成了相当于 C18 的、可被转运并整合到中性脂滴上的脂肪酸分子，将该脂肪酸分子与供试细胞孵育过夜再移除后，可进行下一步相关实验，该方法可以清晰地显示脂肪酸在转运和储存的过程中亚细胞定位及变化情况（Rambold *et al*.，2015）。

4.3 脂滴形态观察法

脂滴形态观察主要是通过染料着色脂滴进行指示或透射电子显微镜对脂滴进行直观观察。染料着色主要包括脂滴的荧光染色和可见光染色，荧光染色最常用的染料是 BODIPY 493/503。利用 BODIPY 对中性脂肪染色后，在荧光显微镜下可以观察到脂滴大小、形态及数量（Singh *et al*.，2009；Rambold *et al*.，2015）。可见光染料以油红 O（oil red O）为代表。油红 O 为脂溶性偶氮染料，可特异性地使组织和细胞内的中性甘油三酯、脂质以及脂蛋白着色，使组织内的脂滴呈红色，通过光学显微镜可观察脂肪形态及大小（Singh *et al*.，2009）。透射电子显微镜观察是另一种重要的脂滴观察方法，首先需要对组织进行固定、包埋、切片等复杂工序，能直观观察到脂肪体大小、数量及位置，可真实反映细胞脂滴积累水平（van Zutphen *et al*.，2014）。

4.4 生物化学法

已知脂肪主要以甘油三酯和胆固醇形式储存于脂滴。脂肪被氧化分解时，由甘油三酯分解成甘油二酯和游离脂肪酸，因此利用比色法检测脂代谢底物及产物可以间接反映自噬和脂代谢之间的关系。王升（2012）使用比色法检测了家蚕血清和脂肪体中甘油三酯或甘油二酯的含量。He 等（2015）用比色法，检测发现诱导小鼠细胞自噬后血清中游离脂肪酸含量增加。此外，脂滴标记蛋白的 Western blotting 检测和免疫荧光染色也是有效的检测手段之一。PAT 家族是最为重要的脂滴表面蛋白，包含 Perilipin，ADRP 和 TIP47 等，它们的蛋白水平和亚细胞定位可以间接显示脂滴数量、大小的变化（Shibata *et al*.，2009，2010；李金存等，2014）。

4.5 色谱分析法

脂代谢组学，即利用色谱分析法对样品中的脂质种类和含量进行鉴定和分析的方法，目前国内外常用的方法有：气相色谱法（gas chromatography，GC）、高效液相色谱（high performance liquid chromatography，HPLC）、气相色谱-质谱联用法（GC-MS）、液相色谱-串联质谱（LC-MS）。通常脂质分为极性的甘油磷脂（glycerophospholipids，GPL）、鞘脂类（sphingolipids，SPL）和非极性的游离脂肪酸、甘油二酯、甘油三酯（triacylglycerol，TAG）、甾醇类及甾醇酯（sterol，ST）。GPL 和 SPL 可以通过正向色谱分离，中性脂滴（TAG 和 ST）可利用反向色谱分离（Shui *et al*.，2010）。

脂肪酸一般以甘油酯形式存在，沸点较高，此法需要先将脂肪酸甲酯化后，使高沸点脂肪酸变成低沸点、易挥发汽化的物质再进行气相色谱测鉴定（李孟楼等，2006；Jung *et al*.，2009）。利用气相色谱法可以测定油葫芦 *Gryllus testaceus*、灰斑古毒蛾 *Orguia ericae*、烟夜蛾 *Heliothis assulta*、银纹夜蛾 *Argyrogramma agnata* 和白薯天蛾 *Herse convolvuli* 共 5 种昆虫脂肪体的脂肪酸种类和含量的差异（李孟楼等，2006）。随着质谱（mass spectrometry，MS）联用技术的发展，在气相色谱的基础上形成了 GC-MS 技术，该方法是先将样品进行甲酯化后经毛细管气相色谱柱分离，再经质谱仪对色谱峰进行鉴定，可鉴定一些未知的色谱峰。采用气相色谱-质谱联用技术对不同杂交组合、不同性别的家蚕蛹的脂肪酸成分进行鉴定分析，结果表明在 5 种杂交组合的蛹脂肪酸共同拥有 5 种脂肪酸，而最丰富的是 α-亚麻酸（龚雪龙等，2010）。同样，采取气相色谱-质谱联用法，发现两广二号、桂蚕 N2 和桂蚕 2 号每个品种都含有 10 种以上的脂肪酸，且油酸含量最高，但是各

品种间蚕蛹油脂肪酸组分的相对含量存在一定差异(陆春霞等, 2015)。

鉴于气相色谱法易使不饱和脂肪酸的双键断裂或双键异构化以及需要样品甲酯化的缺点,严开芹等(2016)对高效液相色谱的柱前衍生条件进行了优化,获得了脂肪酸最优的柱前衍生条件,该条件能最大化地衍生脂质中各种脂肪酸。高效液相色谱法则可以分离分析难以挥发的物质,分离的时间顺序则与脂肪酸的甲酯化、碳链长度和脂肪酸的不饱和程度及不饱和碳原子所在位置有关。利用高效液相色谱结合蒸发光散射检测器,检测发现蚕蛹中脂肪酸主要为亚麻酸、棕榈酸和油酸 3 种(崔志芳和彭奇均, 2014)。在液相色谱的基础上也发展出了 LC-MS 技术,该方法不仅可以达到液相色谱分离物质的目的,还可以实现质谱分析后获得待检测物相对分子质量及结构的详细数据,因此该技术已成为一项重要的现代分离、分析技术。但是 LC-MS 对脂肪酸进行定性鉴定时需要有标准品作为对照,无标准品时测定则较困难。

目前,色谱法用来检测脂质已经被广泛应用在生物学的研究当中,但是还少有作为自噬调控脂代谢的检测手段使用,鉴于色谱法良好的应用前景及使用的实效性,可以被广泛用于检测自噬调控脂代谢的研究中。

5 小结与展望

综上所述,细胞自噬在酵母、哺乳动物等真核生物的脂代谢中扮演重要角色。当营养匮乏时,细胞自噬被诱导进行营养和能量物质的降解,为细胞提供维持生存所必需,帮助细胞度过困难环境。哺乳动物中的研究表明,ATG5, ATG7 和 LC3 蛋白在高脂饮食诱导的噬脂中具有重要作用,其中 LC3 蛋白研究较多,它早在细胞自噬体形成之前可能就与脂滴发生作用,并且其 Ⅰ 型和 Ⅱ 蛋白也可能在脂代谢中存在功能差异。研究还发现,在饥饿促使细胞膜上的脂肪酸转运至脂滴储存的现象中,ATG5 蛋白功能缺失与直接抑制细胞自噬发生存在差异;ATG7 在不同发育时期或是不同生理状态下,其参与调控脂滴形成的功能不完全相同,但上述现象的机制均不详。此外,是否其他 ATG 蛋白也具有参与脂代谢的功能还不清楚, ATG 蛋白介导脂代谢的机制远比我们想象的要复杂。尽管酵母的液泡和哺乳动物的溶酶体都被证实参与脂代谢,然而液泡和溶酶体中究竟是哪些酶参与降解自噬体包裹的脂类还未被鉴定。在真菌中的研究发现,某些关键 *Atg* 基因敲除后,细胞中的脂滴含量减少,对比分析哺乳动物中的相关研究发现,在进化上不同地位的物种中细胞自噬否是差异参与脂质合成与降解还不得而知,这需要在进化上地位中间的物种中进行实验和验证,昆虫正好可以满足相关实验的需求。我们在家蚕中的前期研究发现,在幼虫-蛹变态时期,RNA 干扰几个关键 *Atg* 基因后,自噬体形成受阻抑制了家蚕脂肪体内的脂代谢,而阻止溶酶体酸化也能够减少脂肪的降解(另文发表),可见细胞自噬介导脂肪降解的功能在昆虫至哺乳动物中是相对保守的,因此,利用家蚕等昆虫探讨哺乳动物中自噬介导脂代谢的不明机制是一个具有普遍生物学意义的尝试。

在细胞自噬介导真核生物的脂质合成与降解平衡的研究中,至今尚有许多问题未被解析,其分子机制远超越于我们的所知。果蝇和家蚕作为模式昆虫之一,已有的实验结果初步证明它们中的自噬介导脂代谢的机制与哺乳动物具有一定的保守性。以昆虫作为细胞自噬介导脂代谢研究的模型,其研究结果不但可为以昆虫脂肪体脂代谢与发育为调控靶标的生物防治与利用提供理论指导,还可为高等动物疾病,诸如高血脂引发的肥胖症、心血管疾病、神经退行性疾病等的研究提供借鉴。因此,在昆虫中进行细胞自噬介导脂代谢的研究具有特殊的意义。

参考文献(References)

Baba M, Osumi M, Scott SV, Klionsky DJ, Ohsumi Y, 1997. Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J. Cell Biol.*, 139(7): 1687–1695.

Chang YY, Neufeld TP, 2010. Autophagy takes flight in *Drosophila*. *FEBS Lett.*, 584(7): 1342–1349.

Cui ZF, Peng QJ, 2014. Study on determination of main fatty acids in chrysalis oil by high performance liquid chromatography. *Science and Technology of Food Industry*, 35(10): 71–73. [崔志芳, 彭奇均, 2014. 高效液相色谱法检测蚕蛹油中主要脂肪酸的研究. 食品工业科技, 35(10): 71–73]

Debeer LJ, Thomas J, De Schepper PJ, Mannaerts GP, 1979. Lysosomal triacylglycerol lipase and lipolysis in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 254(18): 8841.

Ding WX, Li M, Chen XY, Ni HM, Lin CW, Gao WT, Lu BF, Stolz DB, Clemens DL, Yin XM, 2010. Autophagy reduces acute ethanol-induced hepatotoxicity and steatosis in mice. *Gastroenterology*, 139(5): 1740–1752.

Duan ZB, Chen YX, Huang W, Shang YF, Chen PL, Wang CS, 2013. Linkage of autophagy to fungal development, lipid storage and virulence in *Metarhizium robertsii*. *Autophagy*, 9(4): 538–549.

Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino SR, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, Asara JM, Fitzpatrick J, Dillin A, Viollet B, Kundu M, Hansen M, Shaw RJ, 2011. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science*, 331(6016): 456-461.

Farah BL, Landau DJ, Sinha RA, Brooks ED, Wu YJ, Fung SY, Tanaka T, Hirayama M, Bay BH, Koeberl DD, Yen PM, 2016. Induction of autophagy improves hepatic lipid metabolism in glucose-6-phosphatase deficiency. *J. Hepatol.*, 64(2): 370-379.

Franzetti E, Huang ZJ, Shi YX, Xie K, Deng XJ, Li JP, Li QR, Yang WY, Zeng WN, Casartelli M, Deng HM, Cappellozza S, Grimaldi A, Xia QY, Feng QL, Cao Y, Tettamanti G, 2012. Erratum to: autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis*, 17(2): 217.

Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G, 2014. Metabolic control of autophagy. *Cell*, 159(6): 1263-1276.

Gong XL, Sima YH, Sun XF, 2010. Gas chromatography/mass spectrometry analysis of fatty acid composition in silkworm pupa. *Acta Sericologica Sinica*, 36(1): 186-189. [龚雪龙, 司马杨虎, 孙晓飞, 2010. 家蚕蛹脂肪酸成分的气相色谱-质谱联用分析. 蚕业科学, 36(1): 186-189]

He B, Liu LT, Yu C, Wang Y, Han P, 2015. Roux-en-Y gastric bypass reduces lipid overaccumulation in liver by upregulating hepatic autophagy in obese diabetic rats. *Obes. Surg.*, 25(1): 109-118.

He Q, Sha S, Sun L, Zhang J, Dong M, 2016. GLP-1 analogue improves hepatic lipid accumulation by inducing autophagy via AMPK/mTOR pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 476(4): 196-203.

Huang R, 2013. Deacetylation of Nuclear LC3 by Sirt1 Is Essential to Autophagy. PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. [黄锐, 2013. Sirt1 调控核内 LC3 脱乙酰化在自噬中的作用研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文]

Huang WP, Klionsky DJ, 2002. Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Struct. Funct.*, 27(6): 409-420.

Jaber N, Zong WX, 2013. Class III PI3K Vps34: essential roles in autophagy, endocytosis, and heart and liver function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1280(1): 48-51.

Jung HJ, Lee WY, Chung BC, Choi MH, 2009. Mass spectrometric profiling of saturated fatty acid esters of steroids separated by high-temperature gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1216(9): 1463-1468.

Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, Adhihetty PJ, *et al*., 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 12(1): 1-222.

Köhler K, Brunner E, Guan XL, Boucke K, Greber UF, Mohanty S, Barth JM, Wenk MR, Hafen E, 2009. A combined proteomic and genetic analysis identifies a role for the lipid desaturase Desat1 in starvation-induced autophagy in *Drosophila*. *Autophagy*, 5(7): 980-990.

Lee IH, Finkel T, 2009. Regulation of autophagy by the p300 acetyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 284(10): 6322-6328.

Li JC, Zheng BX, Wang C, Gao X, Ye J, 2014. Effects of rapamycin on the morphology of lipid droplets and the expression of lipid droplet-associated proteins in mouse primary. *Progress in Modern Biomedicine*, 7(27): 5220-5224. [李金存, 郑秉暄, 王超, 高星, 叶菁, 2014. 雷帕霉素对小鼠原代肝细胞脂滴形态和脂滴表面蛋白表达的影响. 现代生物医学进展, 7(27): 5220-5224]

Li ML, Li SM, Wang D, Liu RP, 2006. Fatty acid composition and contents of five insect species. *Chinese Bulletin of Entomology*, 43(2): 226-228. [李孟楼, 李生梅, 王敦, 刘汝平, 2006. 五种昆虫脂肪酸组分与含量分析. 昆虫知识, 43(2): 226-228]

Li QR, Deng XJ, Yang WY, Huang ZJ, Tettamanti G, Cao Y, Feng QL, 2010. Autophagy, apoptosis, and ecdysis-related gene expression in the silk gland of the silkworm (*Bombyx mori*) during metamorphosis. *Can. J. Zool.*, 88(12): 1169-1178.

Li QR, Deng XJ, Huang ZJ, Zheng SC, Tettamanti G, Cao Y, Feng QL, 2011. Expression of autophagy-related genes in the anterior silk gland of the silkworm (*Bombyx mori*) during metamorphosis. *Can. J. Zool.*, 89(11): 1019-1026.

Lu CX, Liao ST, Wei YX, Liang GQ, Wu JJ, Huang ZY, Dong GQ, Zhou XL, Lu F, 2015. Determination of fatty acid composition in pupal oil of 3 current silkworm varieties. *Science of Sericulture*, 41(6): 1137-1141. [陆春霞, 廖森泰, 韦延秀, 梁贵秋, 吴婧婧, 黄正勇, 董桂清, 周晓玲, 陆飞, 2015. 3 个现行家蚕品种的蚕蛹油脂肪酸组成测定. 蚕业科学, 41(6): 1137-1141]

Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao JH, Goldberg AL, Schiaffino S, Sandri M, 2007. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle *in vivo*. *Cell Metab.*, 6(6): 458-471.

Mariño G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G, 2014. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15(2): 81-94.

Martinez-Lopez N, Singh R, 2015. Autophagy and lipid droplets in the liver. *Annu. Rev. Nutr.*, 35: 215-237.

Massey A, Kiffin R, Cuervo AM, 2004. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36(12): 2420-2434.

Moy RH, Cherry S, 2013. Antimicrobial autophagy: a conserved innate immune response in *Drosophila*. *J. Innate Immun.*, 5(5): 444-455.

Rambold AS, Cohen S, Lippincott-Schwartz J, 2015. Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Dev. Cell.*, 32(6): 678-692.

Romanelli D, Casati B, Franzetti E, Tettamanti G, 2014. A molecular view of autophagy in Lepidoptera. *BioMed Res. Int.*, 2014: 902315.

Shibata M, Yoshimura K, Furuya N, Koike M, Ueno T, Komatsu M, Arai H, Tanaka K, Kominami E, Uchiyama Y, 2009. The MAP1-LC3 conjugation system is involved in lipid droplet formation.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 382(2): 419 -423.

Shibata M, Yoshimura K, Tamura H, Ueno T, Nishimura T, Inoue T, Sasaki M, Koike M, Arai H, Kominami E, Uchiyama Y, 2010. LC3, a microtubule-associated protein1A/B light chain3, is involved in cytoplasmic lipid droplet formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 393(2): 274 -279.

Shintani T, Klionsky DJ, 2004. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 306(5698): 990 -995.

Shui GH, Guan XL, Low CP, Chua GH, Goh JS, Yang HY, Wenk MR, 2010. Toward one step analysis of cellular lipidomes using liquid chromatography coupled with mass spectrometry: application to *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* lipidomics. *Mol. Biosyst.*, 6(6): 1008 -1017.

Singh R, Kaushik S, Wang YJ, Xiang YQ, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ, 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, 458(7242): 1131 -1135.

Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lullmann-Rauch R, Janssen PM, Blanz J, von Figura K, Saftig P, 2000. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*, 406(6798): 902 -906.

Tian L, Li S, 2015. Autophagy studies in *Bombyx mori*. *Invertebrate Surviv. J.*, 12: 103 -108.

Tian L, Ma L, Guo EE, Deng XJ, Ma SY, Xia QY, Cao Y, Li S, 2013. 20-Hydroxyecdysone upregulates *Atg* genes to induce autophagy in the *Bombyx* fat body. *Autophagy*, 9(8): 1172 -1187.

Ueno T, Komatsu M, 2017. Autophagy in the liver: functions in health and disease. *Nat. Rev. Gastro. Hepat.*, doi: 10.1038/nrgastro.2016.185.

van Zutphen T, Todde V, de Boer R, Kreim M, Hofbauer HF, Wolinski H, Veenhuis M, van der Klei IJ, Kohlwein SD, 2014. Lipid droplet autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.*, 25(2): 290 -301.

Wang DK, Tian M, Qi Y, Chen G, Xu LJ, Zou X, Wang KF, Dong H, Lu F, 2015. Jinlida granule inhibits palmitic acid induced-intracellular lipid accumulation and enhances autophagy in NIT-1 pancreatic beta cells through AMPK activation. *J. Ethnopharmacol.*, 161: 99 -107.

Wang S, 2012. Molting Hormone Inducing Fat Degradation and Phosphorylation of PKC Regulating Molting Hormone Signal Transduction Mechanism. PhD Dissertation, Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing. [王升, 2012. 蜕皮激素诱导脂肪降解和 PKC 磷酸化调控蜕皮激素信号转导的机理. 北京: 中国科学院研究生院博士学位论文]

Wani WY, Boyer-Guittaut M, Dodson M, Chatham J, Darley-Usmar V, Zhang JH, 2015. Regulation of autophagy by protein post-translational modification. *Lab. Invest.*, 95(1): 14 -25.

Wen X, Klionsky DJ, 2016. An overview of macroautophagy in yeast. *J. Mol. Biol.*, 428(9): 1681 -1699.

Xie K, Tian L, Guo XY, Li K, Li JP, Deng XJ, Li QR, Xia QY, Zhong YJ, Huang ZJ, Liu JP, Li S, Yang WY, Cao Y, 2016. BmATG5 and BmATG6 mediate apoptosis following autophagy induced by 20-hydroxyecdysone or starvation. *Autophagy*, 12(2): 381 -396.

Xiong XW, Tao RY, DePinho RA, Dong XC, 2012. The autophagy-related gene 14 (*Atg*14) is regulated by forkhead box o transcription factors and circadian rhythms and plays a critical role in hepatic autophagy and lipid metabolism. *J. Biol. Chem.*, 287(46): 39107 -39114.

Yang L, Li P, Fu SE, Calay ES, Hotamisligil GS, 2010. Defective hepatic autophagy in obesity promotes er stress and causes insulin resistance. *Cell Metab.*, 11(6): 467 -478.

Yan KQ, Su KY, Xu YH, Tang JY, Wu Q, 2016. Optimization of pre-column derivatization condition of fatty acid by high performance liquid chromatography. *Science and Technology of Food Industry*, 37(14): 54 -58. [严开芹, 苏可盈, 许洋珲, 唐嘉颖, 吴青, 2016. 高效液相色谱法测定脂肪酸组成柱前衍生条件的优化研究. 食品工业科技, 37(14): 54 -58]

Yi C, Ma M, Ran L, Zheng J, Tong J, Zhu J, Ma C, Sun Y, Zhang S, Feng W, Zhu L, Le Y, Gong X, Yan X, Hong B, Jiang FJ, Xie Z, Miao D, Deng H, Yu L, 2012. Function and molecular mechanism of acetylation in autophagy regulation. *Science*, 336(6080): 474 -477.

Yin VP, Thummel CS, 2005. Mechanisms of steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Sem. Cell Dev. Biol.*, 16(2): 237 -243.

Yorimitsu T, Klionsky DJ, 2005. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.*, 12(2): 1542 -1552.

(责任编辑: 马丽萍)